

Válasz Dr. Erdei László, az MTA Doktora bírálatára

Köszönöm Prof. Dr. Erdei Lászlónak, hogy vállalta az MTA doktora címre benyújtott dolgozatombírálatát, köszönöm értékes megjegyzéseit, kérdéseit.

Felsorolt kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

- 1. UV-B sugárzás.** *A 19. oldalon idézett Ballaré és mtsai. 2011 közleményben a szárazföldi ökoszisztémát ért UV-B besugárzás kismértékű növekedésgátlást (6% alatt) okozott. Egy 10%-os ózon depléciót feltételezve azonban már jelentős gyökér/hajtás arány változás mutatkozott búzanövények esetében (Barabás és mtsai. /1998/ J. Plant Physiol. 153: 146-153.). Jelen értekezésben az UV-B sugárzás módosító hatásait vizsgálva 430 $\mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ dózist használtak (33. old.). Milyen alapon választották ezt a dózist, és hogyan viszonyul ez a természetes besugárzáshoz?*

Az általunk alkalmazott dózis a Magyarországon előforduló kb. kétszerese, és valamivel a Földön természetes körülmények között előforduló felett van, azonban az irodalmi adatok alapján, mesterséges körülmények között alkalmazott kezeléseket nézve azok középtartományába esik. Esetünkben ez a dózis hajtáshossz csökkenést okozott, de ozmotikus stressz során védőhatása volt.

- 2. Anyagok és módszerek. 2. táblázat, mikroelem összetétel.** *A mikroelem koncentrációk mM-os koncentrációban vannak megadva éppúgy, mint a komplexképző EDTA is. Ha ez a törzsoldat, úgy kellett volna jelölni. Ha a mM helyett μM a helyes forma, akkor ez csak egy egyszerű elírás, és így értendő.*

Köszönöm az észrevételt, sajnos elírás maradt a táblázatban.

- 3. Ozmotikus kezelés:** *a 15%-os PEG-6000 oldat milyen mOsm koncentrációt, ill. vízpotenciált (MPa) jelent?*

Az alkalmazott PEG koncentrációját valóban gyakran csak százalékban fejezik ki, néha anélkül, hogy jelölnék vegyes %-os, vagy tömeg %-os oldatról van szó.

Intézetünkben, ahogy ez Molnár István és mtsai. (2004) tanulmányában is olvasható a növény nevelés során alkalmazott 15 % w/v PEG-et tartalmazó tápoldat ozmotikus potenciálja, -0,71 MPa. Hasonlóan Vassilevska-Ivanova és mtsai. (2014) 15%-os PEG-6000 esetén -0,6 MPa-t, Muscolo és mtsai. (2014) -0,51 MPa-t mértek.

A 15%-os PEG koncentráció a dolgozatban is bemutatott eredmények alapján a búza esetében egy enyhébb, a kukorica esetében közepes stresszfaktor volt, melyet a fotoszintézissel kapcsolatos paraméterek is alátámasztottak.

Molnár István, Gáspár László, Sárvári Éva, Dulai Sándor, Hoffmann Borbála, Molnár-Láng Márta, Galiba Gábor (2004) Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Functional Plant Biology* 31, 1149-1159.

Muscolo A Sidari M Anastasi U Santonoceto C Maggio A . 2014. Effect of drought stress on germination of four lentil genotypes. *Journal of Plant Interaction* 9, 354–363.

Vassilevska-Ivanova, R., Shtereva, L., Kraptchev, B., et al. (2014). Response of sunflower (*Helianthus annuus* L) genotypes to PEG-mediated water stress. *Open Life Sciences*, 9(12), pp. 1206-1214.

- 4. A hidegkezelés hatására bekövetkezett szabad zsírsavösszetételben bekövetkezett változásokat különböző lipid frakciókban mutatta ki (nevezetesen a galaktolipidek és foszfolipid frakciók). Kérdésem, hogy a lipid típusok összetételében, arányaiban voltak-e változások? Például a foszfolipidek közül a foszfatidil etanolamin és foszfatidil glicerol esetében változott-e a lipid fajták mennyiségi aránya? Foszfatidil kolin (lecitin) nem volt a membránban?**

A membránfrakciók elválasztása vékonyrétegen történt, bár a rétegekről előhívás után készültek fényképek, de az adott frakciókat jelölő sávok UV fényben tapasztalt szemmel csak szubjektív módon megítélhető intenzitásbeli eltéréseit nem regisztráltuk (az új Metabolomika platform intézetünkben már ezt is lehetővé tenné). Az elválasztás során a monogalaktozil-diacil-glicerol, foszfatidil etanolamin, foszfatidil glicerol, digalaktozil diacil glicerol, szulfokinovozil diacil glicerol, foszfatidil kolin és foszfatidil inozitol elválasztása történhet meg, a rétegen futtatás után, fentről lefelé a fenti sorrendben. Amely sávokat aztán a további metilészteres származékképzéshez lekapargattunk, és GC-MS analízire került. Az utolsó három sáv azonban SQDG, PC és PI azonban sokszor, több ismételten ellenére is nem megfelelően elkülönülten fut a rétegen. Ezért a mondjunk kevesebbet, de biztosan elvet követve, csak a dolgozatban szereplő 4 membránfrakciót elemeztük.

- 5. Ismeretes, hogy hidegkezelés hatására az általában alacsony ABA-szintek megemelkednek, ezért nem meglepő, hogy a legalacsonyabb kezdeti ABA-szinttel bíró tavaszi árpa legnagyobb hideg-indukálta ABA-szintet ért el. Ezzel szemben a tavaszi zabfajták nem mutattak ABA-indukciót a hidegkezelésre, és általában a legkisebb változásokat mutatták egyéb paraméterekben is. Mi lehet ennek az oka? Egyéb, ABA-független gének termékeivel akklimatizálódnak?**

Janda és mtsai. (2004) zabban már kimutatták, hogy Gerald őszi zab a többi gabonafajhoz képest eleve alacsonyabb antioxidáns aktivitásokat mutatott mind a koronában, mind a levélben, utóbbiban pedig a fagytoleranciában fontos szerepet játszó G-POD aktivitás kimutathatatlan volt. Tehát valószínűleg ez a jelenség fajfüggő lehet.

Maldonado és mtsai. (1997) szintén zabban azt vizsgálták, hogy milyen hatása van a vízhiánynak a fagytoleranciára, és azt tapasztalták, hogy a kezelések nem befolyásolták az ABA-tartalmat, valamint, hogy habár az ABA-tartalom összefügghet a zab szárazságtűrésével, de a fokozott fagyállósággal nem. Még korábbi adatok szerint, a vízhiány nem olyan hatékonyan indukálja a fagyűrészt a zabban, mint pl. a búzában (Cloutier et al., 1984).

Az bizonyos, hogy a hidegakklimatizáció ABA-függő és ABA-független jelátviteli útvonalakkal van összefüggésben (Pareek et al., 2017).

Bräutigam és mtsai. (2005) tavaszi és őszi zab fajták hideg akklimatizációját vizsgálták génexpressziós szinten. Megállapították, hogy a hideg hatására leginkább indukálódó géncsoportok szerepeltek, mint pl. CBF1,3,4 (melyek az ABA-függetlenül indukáló jelátvitel tagjai), Cold-induced COR410, LEA/RAB-related COR protein, Ferredoxin, RUBISCO aktiváz, aquaporinok, hidroxiprolinban gazdag glikoproteinek. Továbbá azt is kimutatták, hogy ezen gének aktiválódása nagyobb volt a hidegstresszt követően az őszi fajtákban, mint a tavasziakban. Mivel mi csak tavaszi zabfajtákat vizsgáltunk, ezekben az ABA valóban nem emelkedett meg hidegkezelés után, de ezt nem a tavaszi típusuk indokolta, hiszen a búza és árpa fajok esetében a tavaszi, illetve az őszi vetésű fajták hasonlóan reagáltak. Tehát valószínűleg itt is fajfüggő folyamatokról lehet szó.

Továbbá, a hideg stresszválasz kezdeti fázisa során az ABA felhalmozódás gyors és átmeneti. Búzában Kosová és mtsai (2012) hideg akklimatizáció során a kezelést követő első

napon mérték az ABA felhalmozódás csúcsát (őszi búzában kétszeres, a tavaszi búza értékéhez képest), mely 3-7 napig folyamatosan csökkenő tendenciát mutatott, majd a 21 napon az őszi búzában még mindig jóval a kontroll értéke feletti volt a tavaszi búzához képest.

- Cloutier Y, Andrews CJ. (1984) Efficiency of cold hardiness induction by desiccation stress in four winter cereals. *Plant Physiol.*;76(3):595–598.
- Maldonado, C. A., G. E. Zuniga, L. J. Corcuera, and M. Alberdi, (1997) Effect of water stress on frost resistance of oat leaves. *Environ. Exp. Bot.* 38,99–107.
- Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzalez, K., Veisz, O., Páldi, E. (2003) Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Sci.* 164: 301–306,
- Bräutigam M, Lindlöf A, Zakhrebekova S, Gharti-Chhetri G, Olsson B, Olsson O. (2005) Generation and analysis of 9792 EST sequences from cold acclimated oat, *Avena sativa*. *BMC Plant Biol.*;5:18.
- Kosova, K., Prasil, I. T., Vitamvas, P., Dobrev, P., Motyka, V., Flokova, K., et al. (2012). Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra. *J. Plant Physiol.* 169, 567–576.
- Pareek A, Khurana A, Sharma AK, Kumar R. (2017) An Overview of Signaling Regulons During Cold Stress Tolerance in Plants. *Curr Genomics.*;18(6):498–511.

6. A korreláció analízis számos esetben (például a liztharmat-rezisztencia esetében) szoros, szignifikáns korrelációt mutatott a spermidin és spermin szabad és konjugált, a putreszcin konjugált formái és a szalicilsav szintje között, mégis, a végső következtetés az, hogy nem talált összefüggést ezen paraméterek és a liztharmat-rezisztencia között. Mint magyarázatként írja, a poliaminok katabolizmusa következtében megemelkedett ROS (H_2O_2) szintek lennének a felelősek?

Ugyanakkor rizs növényekben a poliaminok mennyisége nem mutatott összefüggést a stressztolerancia mértékével, és a szalicilsav tartalommal sem.

Kérdésem, hogy mely esetekben lehet közvetlen hatásokról beszélni a korrelációs számítások alapján?

A poliaminok és a szalicilsav között döntően a putreszcin- és szalicilsavtartalom között volt szignifikáns pozitív kapcsolat. Természetesen közvetlen ok-okozati hatást nem lehet levonni a korrelációs elemzésekből, bár ez utóbbi korrelációs kapcsolat a poliamin-kezelések során is kimutatható volt, ahol a nagyobb koncentrációjú, vagy magasabbrendű poliaminok alkalmazása oxidatív stresszt váltott ki a növényekben, ez utóbbi indukálhatta a szalicilsav-felhalmozódást.

Mivel ez a kérdés számunkra is érdekes volt, a dolgozatomban írásával párhuzamosan indultak újabb kísérletek, melyet tavaly sikerült publikálni, és PhD hallgatóm, Tajti Judit dolgozatának részét képezik (Tajti et al., 2019). Így itt csak röviden ismertetném, hogy a kísérlet során poliaminkezeléseket végeztünk Col-0 vad típusú, és szalicilsav-szintézist érintő mutáns *Arabidopsis* genotípusokon (*eds5-1* (enhanced diseased susceptibility) mutáns, mely a SA szintézis egy köztitermékének, az izokorizmátnak a transzportjában gátolt, illetve a *sid2-2* mutáns, melynél a SA bioszintézisében szerepet játszó kulcsenzimek egyike, az izokorizmát hiányzik). Ezen rendszerben a következőkre kerestük a választ: 1. Van-e hatása az *eds5* és *sid2* mutációknak az endogén poliamin-tartalomra, illetve a metabolizmusban érintett génekre? 2. Milyen hatással van a poliaminkezelés a szalicilsavtartalomra és -bioszintézisre ezekben a genotípusokban? Megállapítottuk, hogy kontroll körülmények között a mutációk nem befolyásolták az endogén poliamintartalmat, illetve a metabolizmusban érintett géneket. A poliaminkezelések során a putreszcin mennyisége emelkedett meg, ami *de novo* szintézissel volt összefüggésben. A két szalicilsav-bioszintézis útvonal (PAL és IC) eltérő szabályozottságot mutatott. A poliaminkezelések Col-0 típusban mindkét útvonalat aktiválták. Az *eds5* mutánsban putreszcinkezelés hatására mindkét útvonal aktív volt, de a magasabbrendű poliaminok (spermidin és spermin) míg a PAL útvonalat tovább serkentették addig inkább gátolták az IC útvonal enzimeinek génexpressziós szintjét. A *sid2*-ben az IC-útvonal hiánya miatt a poliaminkezelések hatására a PAL-útvonal aktiválódott és volt felelős a szalicilsav-bioszintéziséért.

7. *Általában...*

„*Általában...*” tett megjegyzéseit köszönöm opponensemnek, a jövőben igyekszem a helyes szemtermés használatára, illetve a nyelvtani figyelmeztetéseket is köszönöm.

Szeretném még egyszer megköszönni Dr. Erdei Lászlónak, hogy időt szánt a dolgozatom alapos áttekintésére, valamint eredményeim új tudományos eredményként való elfogadását.

Martonvásár, 2020. 02. 20.



/Pál Magda/